

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

R-7

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-269999

⑬ Int. Cl.<sup>4</sup>  
 C 12 Q 1/18  
 //(C 12 Q 1/18  
 C 12 R 1:46)

識別記号

庁内整理番号

6807-4B

⑭ 公開 昭和63年(1988)11月8日

審査請求 未請求 請求項の数 6 (全5頁)

⑮ 発明の名称 牛乳中の抗生物質の測定用試験セット及び牛乳中の抗生物質の測定方法

⑯ 特 願 昭63-86222

⑰ 出 願 昭63(1988)4月7日

優先権主張 ⑱ 1987年4月7日 ⑲ フィンランド(FI) ⑳ 871512

㉑ 発 明 者 アンニカ・メイレーメ フィンランド共和国エスエフ - 00170 ヘルシンキ, クリ  
 キネン ステイアニンカツ 7 ペー 21 アー

㉒ 出 願 人 ヴァリオ・マイイエリ フィンランド共和国エスエフ - 00180 ヘルシンキ, カレ  
 ーン・ケスクソスース ヴァンカトウ 56  
 リーケ

㉓ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名

## 明 細 書

## 1. [発明の名称]

牛乳中の抗生物質の測定用試験セット及び牛乳  
 中の抗生物質の測定方法

## 2. [特許請求の範囲]

(1) ストレプトコッカス テルモフィラス  
 (*Streptococcus thermophilus*) T 101 濃縮物  
 及び水性保護剤からなり該濃縮物の水性保護剤に  
 対する希釈率が  $4 \sim 5 \times 10^{-2}$  であることを特  
 徴とする、牛乳中の抗生物質の測定に適した試験  
 セット。

(2) 前記保護剤が 1.1% のグルタミン酸ナ  
 トリウム、1.1% のアスコルビン酸、及び場合  
 により 7% のラクトースからなる水溶液からなり、  
 且つ該水溶液の pH が 6.5 であることを特徴とす  
 る特許請求の範囲第 1 項記載の試験セット。

(3) 試験セットがさらに指示薬を含むことを  
 特徴とする特許請求の範囲第 1 項記載の試験セッ  
 ト。

(4) 指示薬がブロムクレゾールパープルであ

ることを特徴とする特許請求の範囲第 3 項記載の  
 試験セット。

(5) ストレプトコッカス テルモフィラス  
 (*Streptococcus thermophilus*) T 101. D S  
 M 4022.

(6) (i) 水性保護剤への希釈率が  $4 \sim 5 \times$   
 $10^{-2}$  であるストレプトコッカス テルモフィ  
 ラス (*Streptococcus thermophilus*) T 101 濃  
 縮物、水性保護剤及び、場合により、指示薬から  
 なる試験セットに試料を加え、もし前記試験セッ  
 トに指示薬が含まれていない場合、指示薬も加え;

(ii)  $38 \sim 42^\circ\text{C}$  で約 4 時間、試験セッ  
 ト及び試料を培養し;そして

(iii) 色調を評価する

各行程によって特徴づけられ牛乳中の抗生物質を  
 測定する方法。

## 3. [発明の詳細な説明]

本発明は牛乳中の抗生物質の測定に適した試験  
 セットに関する。本発明は、さらに該試験セット  
 に使用されるべき新規ストレプトコッカス テル

モフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 菌株、及び前記試験セットによる牛乳中の抗生物質の測定法に関する。

数多い状況の中で、少量の抗生物質の存在を検出できることは、きわめて重大なことである。例えば、食品産業の場合には、動物の治療の際の抗生物質及び化学療法剤の増大した使用により、簡便で信頼性が高く且つ感度の良い測定方法が必要になっている。抗生物質が乳牛の治療にも使用されるため、そして牛乳中の残留抗生物質が健康に危険をもたらしかねること及び食品科学技術上の理由から不利益でありうることの両方のため、正確で迅速な牛乳のスクリーニングに適した方法の開発が特に重要である。

牛乳中の残留抗生物質は、一般に、菌が寒天培地上で酸を産生し、退色し、増殖できるという事実を利用する微生物学的方法により、測定されている。これらの方法は、特定の微生物に対する抗生物質の殺菌性、阻害性及び形態学的効果に基づいている。

試験微生物として使用する。アンプル中の寒天培地上に試料(0.1 ml)をピペットで測りこみ、栄養素及びpH指示薬を含むタブレットを該アンプルに加える。この方法は、試験微生物の酸産生能力に基づくものである。アンプルを64℃で2時間半培養する。寒天培地層の色の变化に基づいて評価する。

標準的な方法には、さらにインターテスト (Inter-test) (BCP-試験)がある。その方法に使用される試験細菌は、ストレプトコッカス テルモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) である。試験細菌の凍結乾燥培養菌、栄養素、及びpH指示薬(プロモクレゾールバール)が入った試験用タブレットを牛乳試料に添加する。培養時間は45℃で4時間である。試料に抗生物質が含まれていない場合、溶液の色は青色から緑色に変化し、さらに黄色に変化する。抗生物質の量は、カラーマップと色を比較することに基づいてある程度まで測定可能である[ソログード(THOROGOOD)氏等著、「チャーム テスト (Charm Test) の評

サーモカルト ディスク (Thermocult disk) 法は、フィンランドで広く使用され、公定の抗生物質測定法として受け入れられている寒天拡散法である。この方法において、試験微生物はビー・ステアロテルモフィラス・バー・カリドラクティス (*B. Stearothermophilus* var. *calidolactis*) である。それはIDF標準方法 [IDF 1970年 平板試験法による牛乳中のペニシリンの検出 (Detection of Penicillin in Milk by a Disk Assay Technique)、国際標準F I L - I D F 57 ブルッセル] に基づいて開発された。

対応感度の方法は、バンオーエス (Van O S) 氏等著、「牛乳中の残留抗生物質の測定の為の拡散試験 (Diffusion Test for the Determination of Antibiotic Residues in Milk)」[ネザーランド ミルク アンド デアリイ ジェイ (Neth. Milk and Dairy J.) 第29巻 16頁 1975年]に開示されている。該検出試験もまたビー・ステロテルモフィラス・バー・カリドラクティス (*B. Stearothermophilus* var. *calidolactis*) を

価一牛乳中のペニシリンの検出の為の迅速な方法 (An Evaluation on the Charm Test-A Rapid Method for the Detection of Penicillin in Milk) ジェイ・デアリイ・リサーチ (J. Dairy Research) 第50巻 185頁 1983年]。

牛乳生産技術の必要性から見ると、これらの方法の欠点は、それらの感度が不充分であることである。

化学的若しくは物理化学的な方法による牛乳中の残留抗生物質の測定は、通常微生物学的方法に比べてほとんど用いられない。比色測定法及びクロマトグラフィ法は、熟練者並びに、しばしば複雑で高価な分析装置を必要とする。該方法はルーチン分析には殆んど適さない。

チャーム テスト (Charm test) [チャーム エス・イー (CHARM, S. E.) 氏著、「ペニシリン及び他の抗生物質のための15分試験 (A15-minute Assay for Penicillin and other Antibiotics)」カルチャーデアリイ プロダクツ ジェイ (Cultured Dairy Products J.) 第14巻 24頁

1979年]は放射能の検出に基づいている。ビー・ステアロサーモフィルス (*B. stearothermophilus*) 培養菌の凍結乾燥培養菌及び凍結乾燥した<sup>14</sup>Cで標識ペニシリンを試料に添加する。該菌の細胞に含まれる<sup>14</sup>Cの量をガイガーカウンターにより検出する；試料のペニシリン濃度が低い程、ガイガーカウンターの読みは高くなる。検出時間はわずか15分であり、且つこの方法の感度は、0.005I.U. ペニシリン/μlである。この方法もまたルーチン使用には適さないばかりでなく該方法は高価で、複雑で、且つ、実施するためには、熟練者、及び高価な装置を必要とする。

従って、可能なかぎり広域抗菌スペクトルの感度の良い方法に対するまだ実用上の要求がある。該方法はまた簡便でなければならぬし、直ちに使用できるように調整された装置によって該方法を実施することが可能でなければならぬ。該装置による試験は熟練者を必要としないし、例えば農場でも実施することができる。

のラミー (Lami) バクターチーズ製造所で分離された。該菌株は、寄託番号DSM第4022番なる番号で1987年3月3日にドイツの微生物寄託収集機関 (the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen) に寄託された。そして、該菌株は次の特性を有する：

グラム陽性；

長い連鎖状の球菌を形成する；

増殖温度： 50℃で増殖し、10℃で増殖しない；

塩抵抗性： 濃度2%のNaClで増殖し、濃度6.5%のNaClで増殖しない；

42℃で7時間培養した後の滴定酸度：

25~29°SH (滅菌済10%粉乳牛乳)；

乳糖%： 0.8% (42℃で2日間培養、粉乳牛乳より)

ラクトース、サッカロース及びグルコースを発酵する。

従来技術で与えられる面から判断すると、上記新規微生物菌株は明らかに公知のストレプトコ

これらの利益は、本発明に従う試験セットにより得られる。本発明は、該試験セットがストレプトコッカス テルモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) T101濃縮物及び水性保護剤からなり、該菌の水性保護剤への希釈率が $4 \sim 5 \times 10^{-2}$ であることを特徴とする。

本発明に従って、測定を次のように実施する；即ち、ストレプトコッカス テルモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) T101濃縮物、水性保護剤 (該濃縮物の保護剤への希釈率は $4 \sim 5 \times 10^{-2}$ である) 及び、場合により、指示薬からなる試験セットに試料を加え、もし前記試験セットに指示薬が含まれていない場合、指示薬も加え；

38~42℃で約4時間、試験セット及び試料を培養し；そして

色調を評価する。

本発明は新規ストレプトコッカス テルモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) T101菌株に基づいており、その菌株は、バリオ (Valio)

カス テルモフィラス (*Streptococcus thermophilus*) 菌株より一層感度が良く、特にペニシリン及びオキシテトラサイクリンに対して感度が高い。

本試験セットは以下の方法で調製される；前記新規微生物菌株を、ホエーパーミエート (Whey permeate) ベース培地中で、pH6.2~6.5でかつ38~42℃で発酵槽中で増殖する。増殖を観察し、対数的増殖段階の最終時点で増殖を停止する。その後培養ブロス濃度を20倍の濃度まで濃縮によって濃縮する。該濃縮物を、保護剤中に、希釈率が約 $4 \sim 5 \times 10^{-2}$ 、好ましくは約 $5 \times 10^{-2}$ になるように調製する。保護剤は、凍結乾燥微生物試料の調製に使用される水性保護剤よりなってもよい。好ましくは該保護剤は1.1%のグルタミン酸ナトリウム、1.1%のアスコルビン酸、及び場合により7%のラクトースからなる水溶液であり、且つそのpHは6.5である。指示薬を保護剤に添加するか、又は、指示薬を測定と関連させて試験セットに添加することができる。該指示薬は例え

ば、ブロムクレゾールパープル等の酸塩基指示薬である。前記菌懸液を通常のアンプル、栓付試験管、試料瓶等の容器に涵りこむ該容器を炭酸ナトリウムアルコール浴中で冷却し、その後凍結乾燥し、そして真空下で貯蔵する。完成した試験セットは、1ml当たり約 $1 \sim 2 \times 10^8$ の菌を含む。

抗生物質の測定を試験セットに液状試料及びもし必要なら指示薬を添加することにより実施する。該試験セット及び試料を培養し、色の変化を観察する。もし試料が抗生物質を含むなら、試験セットの微生物は増殖できず、色は変化しない。一方、もし試料が抗生物質を含まないなら、該微生物は増殖し且つ増殖中に色の変化を起こす。

本発明の方法の感度を、対応する市販用のサーモカルト (THERMOCULT) [オリオン ダイアグノスティカ (Orion Diagnostica)] 及びデルボテスト (DELVOTEST) P [ギストープロカデス (Gist-Brocades)] 法並びにチャーム (CHARM) II 法と比較した。試料は95℃の温度で5分間予備加熱した牛乳からなり、測定を製造業者によって与え

られた指図に従って実施した。結果を次の表に示す。この表には、さらにインターテスト (INTER-TEST) に関する製造業者のインターベット (Inter-vel) により与えられたデータも示した。結果は、本発明に従った方法は他の方法により一層感度が良く、すべての種類の抗生物質/その組み合わせの存在を明確に検出することを示している。

表  
試験した測定方法による実験的に測定した抗生物質の感度 ( $\mu\text{g/ml}$ )

抗生物質	本発明による方法		サーモカルト		デルボテストP		インター テストb)	チャーム テストII
	A	B	独自の 測定	(S&S) a)	独自の 測定	(S&S) a)		
ペニシリン	0.001- 0.002 I.U.	0.001- 0.002 I.U.	0.006- 0.0075	0.005- 0.0075	0.0025	0.0025	0.005	0.003
ストレプトマイシン	1.25	0.25-0.4	5.0	2.5-5.0	5.0	2.5-5.0	5.0	0.1
テトラサイクリン	0.05-0.1	0.05	0.2 c)	0.1	0.2	0.1	0.5	0.2
オキシテトラサイクリン	0.1	0.05	0.2 c)	0.1	0.2	0.1	0.2	
アンピシリン	0.01	0.003	0.01 c)	0.005	0.01 a)	0.005	0.005	
エリスロマイシン	0.01-0.05	0.01	0.1 c)	0.5-0.75	0.1 c)	0.75-1.0	0.1	0.01
クロラムフェニコール	0.1-0.5	0.1	1.0 c)	7.5	1.0 c)	7.5-10.0	1.0	0.05
ネオマイシン	0.5	0.1-0.2	0.5	1.0	1.0	0.5	20.0	
ストレプトマックス (ペニシリン+ストレプトマイシン)	0.004 I.U. PEN +0.001 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン		0.01 I.U. PEN +0.008 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシン					
マスタートロン (オキシテトラサイクリン+その他)	0.1	0.05	0.2 c)					

A 試験に関連して指示薬を添加 (試験時間4時間)

B 凍結乾燥前に指示薬を添加 (試験時間5時間)

a) サンドストレム及びシベレ (Sandström & Sivelä) 氏による、カルヤンツオーテ (Karjantuo) 第4巻 1984年

b) 製造業者によって与えられた濃度

c) 測定不能

## (実施例 1)

## 試験セットの調製

ストレプトコッカス テルモフィラス(*Streptococcus thermophilus*) T101の菌を次の組織を有する培地に接種した:

ホエーバーミエート粉末	5%
カゼイン水解物	1.5%
トリアトン	0.5%
酵母エキス	1%

培地は120℃の温度で15~20分間滅菌し、滅菌後のpHは6.4であった。

該試験菌株をpH約6.2及び約42℃の温度で発酵槽中で増殖し、且つ増殖を、培地プロセスの濁度を観察することによって監視した。対数的増殖段階の最終時点で増殖を停止し、そして培地プロセスを20倍の濃度までミリポア ペリコン(Millipore Pellicon) 濾過装置(0.45μm)を使用して濾過によって濃縮した。該操作によって菌濃縮物の濃度は $2 \times 10^8$  菌数/mlとなった。

該濃縮物を少量の保護剤で洗<sup>係</sup>滌し、約5mlの濃

牛乳を使用した。牛乳が抗生物質を含む場合、色は青色に変化した。黄色は陰性の結果を示した。

菌物を100mlの保護剤に添加して試験セットとした。(又該試験セットに1mlのプロモクレゾールパープル着色剤(0.8%溶液)を添加したのも試験セットとすることができた。)その様にし得られた菌濃縮物の溶液は、約 $1 \times 10^8$  菌数/mlであった。1mlの溶液を、乾燥に耐え且つ真空密封が可能な通常の10mlアンプルに加えた。該アンプルを-60℃の温度の炭酸-スルフィットアルコール浴中で急冷(20~60秒)し、その後、凍結乾燥し、貯蔵用に真空密封した。この様にして調製したアンプルは、 $1 \sim 2 \times 10^8$  菌数/mlであった。

## (実施例 2)

## 牛乳試料中の抗生物質の測定

牛乳を95℃の温度で5分間加温した。2mlの加温済牛乳及び20μlの着色指示薬を実施例1に従って調製した試験セットに添加した。該試験セットを4時間約42℃の温度で培養し、その色調を評価した。対照標準として発酵した牛乳粉末から調製し、且つ95℃の温度で5分間加温した

代理人 井理士 湯 浅 恭

(外4名)

